doi:10.13866/j.azr.2019.05.18

干旱区不同类型盐碱土壤细菌群落多样性①

王巍琦，李变变，张 军，杨 磊，张凤华
（石河子大学/新疆生产建设兵团绿洲生态农业重点实验室，新疆 石河子 832003）

摘　要：以玛纳斯河流域的硫酸盐—氯化物盐型、氯化物—硫酸盐型、碳酸盐型、硫酸盐型4种盐碱土壤为研究对象，利用高通量测序技术对细菌进行测序，研究表明：4种盐碱土壤样品共获得137 822条细菌基因序列，Shannon指数和Chao1指数表现为：碳酸盐型>硫酸盐型>硫酸盐—氯化物盐型>氯化物—硫酸盐型，说明碳酸盐型土壤细菌群落的多样性和丰度均显著高于其他3个样品。4种盐碱土壤细菌群落主要包括10个门类，其中变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)是硫酸—氯化物盐型、氯化—硫酸盐型、硫酸盐型土壤的优势菌门，碳酸盐型以厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门、放线菌门为优势菌门，而在属的水平上，各样品的群落组成差异较大。通过聚类分析将4个细菌群落分为3类，其中硫酸—氯化物盐型和氯化—硫酸盐型分为一类，硫酸盐型和碳酸盐型各为一类。环境因子中全盐、氯离子、硫酸根离子和硝酸根离子对物种分布影响显著($P<0.05$)。玛纳斯河流域不同类型盐碱土壤中的细菌群落存在显著差异，存在较多类型的细菌群落，尤其在碳酸盐型土壤中。该研究结果揭示了干旱区不同类型盐碱土壤细菌群落组成及影响群落结构的主要环境因子，为挖掘盐碱土壤微生物资源和盐碱地改良提供科学依据。

关键词：盐碱地；土壤微生物；高通量测序；细菌群落；多样性；新疆

我国是世界第3大盐碱土国家，盐碱地总面积达到9.9×10^7 hm^2，类型众多[1]，主要分布在我国华北、东北和西北的内陆干旱、半干旱地区，以及东部沿海的滨海地区[2]。我国主要的盐碱土壤类型包括富含硫酸盐的西北内陆荒漠盐碱地，以氯化盐为主的滨海盐碱地，以碳酸盐、碳酸氢盐为主的东北盐碱地[3]，而新疆因其独特的地理位置和气候环境造就了不同类型的盐碱土壤，被称为世界盐碱土的博物馆[4]。丰富的盐碱地资源为研究盐碱土壤提供了良好的天然环境，独特的生态环境也蕴藏着特殊多样的微生物资源。在这些高盐、高碱的环境中生存的微生物形成了独特的机能、结构和遗传特性[5]，而不同类型的盐碱土壤组分可能成为驱动微生物差异的重要因素，也为特殊微生物提供了良好的生存环境。

随着高通量测序技术的广泛应用，可以更全面、准确地分析盐碱环境微生物多样性特征，也为进一步挖掘微生物信息提供了有力支撑。近年来，许多学者针对不同程度和不同类型盐碱土壤与微生物的关系开展了大量研究。孙慧等[6]和李新[7]分别对余姚滨海地区和内蒙古河套平原的研究结果均表明，微生物多样性随着盐碱程度增加而降低。盐碱土常由盐土和碱土混合存在，其盐分类型也较为复杂，通常由硫酸盐、氯化物、重碳酸盐等组成[8]，且不同地区的盐分组成存在一定差异[9]。针对不同类型的盐碱胁迫，土壤细菌群落会通过调节物种组成来适应，不同类型的盐碱土壤中细菌群落也存在差异[10]。牛世全等[11]通过对比原生盐碱土、次生盐碱土和农田土壤之间的细菌群落组成，发现3种土壤类型的细菌多样性有显著差异，而pH是主导差异的主要因素。俞冰倩等[12]选取了全国范围内5种不同类别盐碱土壤，发现不同盐碱土壤中优势菌群均能适应Cl^-、SO_4^{2-}或HCO_3^-/CO_3^{2-}，表明盐碱土壤阴离子类型及浓度能够影响细菌群落组成。本研究选取干旱区玛纳斯河流域不同类型盐碱土壤为研究对象，避免了不同区域气温、降水等因素的影响，利用高通量测序技术对不同盐碱土壤中微生物群落组成与结构进行研究，分析微生物群落与土壤理化性质的关系，进一步阐明干旱区盐碱土壤中影响微生物群落的关键环境因子，为挖掘盐碱土壤微

① **收稿日期：**2018-11-20； **修订日期：**2019-03-11
基金项目：兵团科技攻关与成果转化项目(2016AD022)；国家自然科学基金项目(31560359)资助
作者简介：王巍琦(1993-)，男，硕士研究生，从事土壤环境与生态安全研究. E-mail:812105845@qq.com
通讯作者：张凤华. E-mail:zfh2000@126.com

生物资源和改良利用盐碱土壤提供科学依据和理论支持。

1 材料与方法

1.1 研究区概况

研究地点位于玛纳斯河流域(85°01′~86°32′E，43°27′~45°21′N)，地处天山北麓中段，准噶尔盆地西南部，总面积3.09×10^4 km^2。该流域地处欧亚大陆腹地，远离海洋，气候干燥，年均气温4.7~5.7 ℃，其中最高气温达43 ℃，最低气温为-42.8 ℃；年均降水量115~200 mm，由南向北递减，且夏季多冬季少；年均蒸发量1 500~2 100 mm[13]，为典型的温带大陆性气候。玛纳斯河流域地势由东南向西北倾斜，由南向北依次为高山区、山区、冲积扇、绿洲灌区和荒漠区5种地貌单元[14]，不同地貌单元间土壤剖面盐分分布、积盐强度和集聚特征有明显差异，该区域主要分布盐化灰漠土、碱化灰漠土、灰漠土和风沙土[15]。

1.2 试验设计和样品采集

试验于2017年7月在玛纳斯河流域内开展盐碱土壤分布调查，调查范围涉及玛纳斯县、沙湾县和农八师的12个团场。按照阴离子当量比选取硫酸盐—氯化物盐型、氯化物—硫酸盐型、碳酸盐型和硫酸盐型4种盐碱土壤作为研究样本，采样时未发现土壤表层有生物结皮。每个处理随机选取3个10 m×10 m的样方作为重复，相邻的样方之间保持一定的距离(不小于10 m)。每个样方内采集优势植被覆盖下的0~20 cm土壤(表1)，采用"S"形采样法采集5个土壤样品，并将5个土壤样品充分混合形成1个混合样品。设4个处理、1个土层、3个重复，共计12个混合样品。去除植被根系及残体后将土壤样品装入灭菌的自封袋中，储存于干冰中立即带回实验室。每个土壤样品被分为两部分，一部分保存于-80 ℃冰箱用于微生物多样性分析，另一部分风干后用于土壤理化性质分析。土壤样品最终送于上海美吉生物科技有限公司进行测序。

表1 不同样地植被种类描述

Tab.1 Plant species in different sample plots

样地类型	优势植被
硫酸盐—氯化物盐型	盐爪爪 *Kalidium foliatum* (Pall.) Moq.
氯化物—硫酸盐型	骆驼刺 *Alhagi sparsifolia* Shap.
碳酸盐型	盐地碱蓬 *Suaeda salsa* (Linn.) Pall.
硫酸盐型	骆驼刺 *Alhagi sparsifolia* Shap.

1.3 土壤理化性质的测定

土壤pH测定采用电极法(水土比为5∶1)；电导率采用电导率仪测定(水土比为5∶1)；有机质采用重铬酸钾容量-外加热法；碱解氮采用碱解扩散法；速效磷采用0.5 mol·L^{-1} $NaHCO_3$浸提-钼锑抗比色法；速效钾采用NH_4OAc浸提-火焰光度法；全磷采用NaOH熔融-钼锑抗比色法；全氮采用凯氏定氮法；全盐采用残渣烘干质量法；土壤样品中的HCO_3^-和CO_3^{2-}的含量采用双指示剂-中和滴定法[16]。Cl^-、SO_4^{2-}和NO_3^-的含量采用离子色谱法测定，仪器为美国Thermo Fisher ICS1100型离子色谱仪，使用氢氧化钠淋洗液体系，采用国家有色金属及电子材料分析测试中心配制的混合标准样品稀释成不同浓度进行标曲制作。

1.4 DNA提取、PCR扩增和Illumina MiSeq测序

使用FastDNATM Spin Kit for Soil试剂盒(MP Biomedicals)从0.5 g土壤样品中提取基因组DNA。用NanoDrop 2000分光光度计分离DNA浓度。

根据文献〔17〕的方法对细菌16S rRNA基因的515-907(V4-V5)区域的PCR进行扩增。515F(5′-GTGCCAGCMGCCGCGG-3′)为正向引物，907R(5′-CCGTCAATTCMTTTRAGTTT-3′)为反向引物。PCR试验采用TransGen AP221-02：TransStart Fastpfu DNA Polymerase，20 μL反应体系：5×FastPfu Buffer，4 μL；2.5 mmol·L^{-1} dNTPs，2 μL；Forward Primer(5 μmol·L^{-1})，0.8 μL；Reverse Primer(5 μmol·L^{-1})，0.8 μL；FastPfu Polymerase，0.4 μL；Template DNA，10 ng，补ddH_2O至20 μL。PCR仪：ABI GeneAmp® 9700型，PCR反应参数：1×(95 ℃，3 min)；27个循环(模板DNA变性：95 ℃，30 s；模板DNA与引物退火：55 ℃，30 s；引物延伸：72 ℃；45 s)；最终延伸：72 ℃，10 min；10 ℃保存。

使用AxyPrepDNA凝胶回收试剂盒(AXYGEN公司)切胶回收PCR产物，Tris-HCl洗脱；2%琼脂糖电泳检测参照电泳初步定量结果，将PCR产物用QuantiFluorTM-ST蓝色荧光定量系统(Promega公司)进行检测定量。构建MiSeq PE文库，使用中国上海美吉生物医药科技有限公司Illumina MiSeq PE300测序平台进行测序。

1.5 测序数据处理

分析前，使用QIIME (version 1.9.1)对序列质

量进行质控和过滤。遵循:① 过滤 reads 尾部质量值 20 以下的碱基,设置 50 bp 的窗口,过滤质控后 50 bp 以下的 reads;② 准确匹配条码,在引物的匹配过程中有 2 个核苷酸不匹配将被移除;③ 对重叠区域超过 10 bp 的序列进行装配,不能被分析的 reads 将被丢弃。

使用 Userach (vsesion 7.1)在 97% 相似水平下对所有序列进行 OTU (operational taxonomic units)聚类,使用 UCHIME 方法检测并去除 Chimeric 序列[18]。采用 RDP Classifier (version 2.2)对 Sliva (Release 123)16S 细菌核糖体数据库进行分类分析,置信度阈值为 0.7[19]。

1.6 数据分析与制图

Alpha 多样性分析,包括群落丰富度指数(Chao1 和 ACE)、群落多样性指数(Shannon 和 Simpson),使用 Mothur (version v.1.30.1)指数分析,用于指数评估的 OTU 相似水平 97%[20]。

$$S_{chao1} = S_{obs} + \frac{n_1(n_1 - 1)}{2(n_2 + 1)} \quad (1)$$

式中:S_{chao1} 表示估计的 OTU 数;S_{obs} 表示实际观测到的 OTU 数;n_1 表示只含有一条序列的 OTU 数目;n_2 表示只含有 2 条序列的 OTU 数目。

$$S_{ACE} = \begin{cases} S_{abund} + \dfrac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \dfrac{n_1}{C_{ACE}}, \; for\ \hat{\gamma}^2_{ACE} < 0.80 \\ S_{abund} + \dfrac{S_{rare}}{C_{ACE}} + \dfrac{n_1}{C_{ACE}}, \; for\ \hat{\gamma}^2_{ACE} \geq 0.80 \end{cases} \quad (2)$$

式中:n_i 表示含有 i 条序列的 OTU 数目;S_{rare} 表示含有"abund"条序列或者少于"abund"的 OTU 数目;S_{abund} 表示多于"abund"条序列的 OTU 数目;abund 表示"优势"OTU 的阈值,默认为 10。

$$H_{shannon} = -\sum_{i=1}^{S_{obs}} \frac{n_i}{N} \ln \frac{n_i}{N} \quad (3)$$

式中:S_{obs} 为实际测量出的 OTU 数目;n_i 为第 i 个 OTU 所含的序列数;N 为所有的序列数。

$$D_{simpson} = \frac{\sum_{i=1}^{S_{obs}} n_i(n_i - 1)}{N(N - 1)} \quad (4)$$

式中:S_{obs} 为实际观测到的 OTU 数目;n_i 为第 i 个 OTU 所含的序列数;N 为所有的序列数。

统计分析使用 SPSS 19.0,Canoco 5.0。数据分析使用单因素方差分析,多重比较使用 Duncan 检验($P < 0.05$)。相关性分析采用 Pearson 和 Spearman 相关系数法。相关制图及分析采用上海美吉生物医药科技有限公司的 I-Sanger 云平台,R 语言采用 Vegan 数据包。

2 结果与分析

2.1 土壤理化性质

盐碱土壤样品理化性质如表 2 所示,4 种盐碱土壤 pH 为 9.05 ~ 10.89,由低到高依次为硫酸—氯化物盐型、氯化—硫酸盐型、硫酸盐型、碳酸盐型,4 个样品的 pH 整体都较高。土壤盐分总体差异较大,氯化—硫酸盐型含盐量最高,达 3.38%,而碳酸盐型含量最低,只有 0.36%。硫酸—氯化物盐型和氯化—硫酸盐型的 SO_4^{2-}、Cl^-、NO_3^- 含量均高于其他 2 种土壤。4 种盐碱土壤中均存在一定含量的 HCO_3^-,但碳酸盐土壤中 HCO_3^- 显著($P < 0.05$)高于其他 3 种盐碱土壤。各样品的养分含量普遍较低,其中硫酸—氯化物盐型土壤 6 种养分指标均显著低于其他 3 种盐碱土壤。

2.2 细菌 α - 多样性

从图 1 可以看出,4 个样品的稀释曲线基本上趋于平缓,表明测序已趋于饱和,结合样品的覆盖率,说明该测序结果中包含了大多数微生物群类,能够真实地反映4个盐碱土壤样品中微生物的群落组

表 2 样地土壤理化性质(0 ~ 20 cm)

Tab.2 Physicochemical properties of soil in sample plots (0 – 20 cm in depth)

盐碱地类型	pH	全盐 /%	有机质 /(g·kg⁻¹)	全氮	全磷	碱解氮 /(mg·kg⁻¹)	速效磷	速效钾	Cl^- /(g·kg⁻¹)	SO_4^{2-}	HCO_3^-	NO_3^-
硫酸—氯化物盐型	9.05c	1.33b	3.56c	0.28c	0.36b	10.25b	4.32d	340.58c	21.06a	18.55a	0.09b	4.94b
氯化—硫酸盐型	9.20c	3.38a	9.62a	0.67a	0.62a	34.45a	14.56a	505.64b	10.96b	14.64b	0.05b	5.75a
碳酸盐型	10.89a	0.36c	7.41b	0.41b	0.59a	33.1a	11.68b	585.41a	0.03d	0.11d	0.22a	0.09d
硫酸盐型	9.53b	0.68bc	8.32a	0.72a	0.58a	32.18a	8.07c	593.63a	0.34c	0.76c	0.09b	0.20c

注:同列不同字母之间表示不同盐碱类型有显著差异($P < 0.05$,Duncan 检验)。

表 3 每个样品的 MiSeq 测序结果和多样性指数

Tab. 3 MiSeq sequencing results and diversity indices for each sample

处理	测序结果			多样性指数			
	优化序列数	有效序列数	OTU 数	Chao1	ACE	Shannon	Simpson
硫酸—氯化物盐型	32 563	22 897	667	336	337.04	4.17	0.03
氯化—硫酸盐型	35 507	22 379	561	290.62	289.62	3.5	0.09
碳酸盐型	32 339	23 291	865	384.89	377.81	4.45	0.03
硫酸盐型	37 413	23 864	811	351	344.3	3.89	0.05

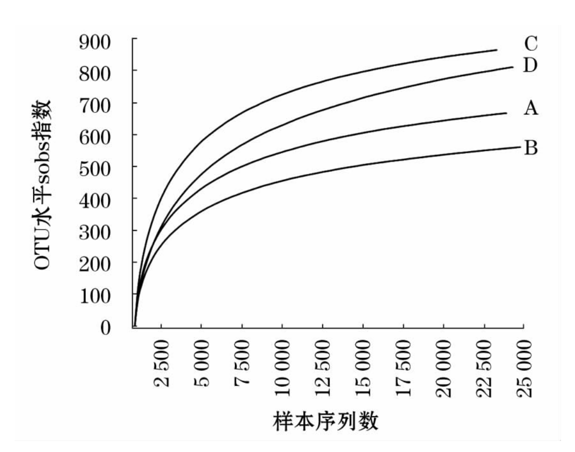
成。本次测序共获得 137 822 个优化序列,各样本的优化序列数在 32 339 ~ 37 413 之间(表 3)。有效序列范围在 22 379 ~ 23 864,4 个样品中的有效序列数量差异较小。氯化—硫酸盐型土壤样品中的 OUT 最少,碳酸盐型土壤样品检测出较高的 OUT。氯化—硫酸盐型土壤样品检测到较高的优化序列数,但其 OUT 数量、Shannon 指数、ACE 指数、Chao1 均表现最小,表明其在细菌的多样性和丰富度上与另外三种类型盐碱土壤相比均最低。硫酸—氯化物型和硫酸盐型土壤样品在 Chao1、ACE 指数较为接近,表明这 2 个样点的菌群丰富度较为相似。Shannon 指数表现为:碳酸盐型 > 硫酸—氯化物盐型 > 硫酸盐型 > 氯化—硫酸盐型,硫酸—氯化物型和碳酸盐型土壤的 Simpson 指数相同,表明二者具有相似的群落多样性。总体来说,在 4 种不同类型盐碱土壤中,碳酸盐型土壤样品中的细菌群落具有较高的多样性和丰富度。

2.3 细菌类群

通过图 2 显示出 4 种不同类型盐碱地土壤微生物 OTU 的数量和组成。在属水平下,4 个样品共检出 1 249 个 OTU,4 种类型共有 OTU 为 110 个,占总数的 8.81%。硫酸—氯化物盐型、氯化—硫酸盐型、碳酸盐型、硫酸盐土壤检出的 OTU 数分别为 310、353、265 个和 321 个,其中碳酸盐型检出数量最多,氯化—硫酸盐型数量最少。各样本中各自独有的 OTU 数分别为 10、46、17 个和 56 个,占到各自 OTU 数的 3.23%、13.03%、6.64% 和 17.45%。

2.4 细菌群落组成

4 个不同盐碱土壤中共检测到 18 个不同的细菌门,不同盐碱土壤中的细菌群落存在较大差异。变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)在硫酸—氯化物盐型、氯化—硫酸盐型、硫酸盐型 3 种土壤中均拥有较高的相对丰度,其总相对丰度超过了 50%(图 3),这 3 类菌群是 3 种盐碱土壤的优势菌群,但组成比例存在一定差异。相较于其他 3 种盐碱土壤,碳酸盐土壤细菌群落中厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度达到 17.97%,与变形菌门、放线菌门成为该土壤细菌群落的优势菌群;而拟杆菌门在碳酸盐土壤群落中相对丰度仅有 10.28%,而在其他 3 种盐碱土壤中均超过 15%,最高达到 32.3%。碳酸盐土壤细菌群落中厚壁菌门、芽单胞菌门(Gemmatimonadetes)、绿弯菌门(Chloroflexi)的相对丰度均大于其他



注:A、B、C、D 分别代表硫酸—氯化物盐型、氯化—硫酸盐型、碳酸盐型、硫酸盐型。下同。

图 1 稀释曲线

Fig. 1 Rarefaction curves of OTU numbers

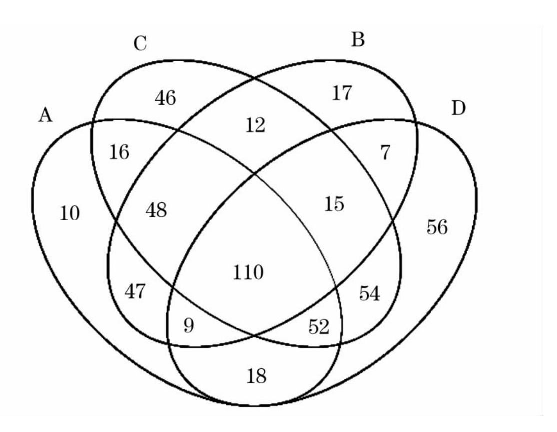


图 2 属水平下 Venn 图

Fig. 2 The total and unique OTU of sample at genus level

3 种盐碱土壤。变形菌门是氯化—硫酸盐型土壤中相对丰度最高的细菌门，达到 42.47%。放线菌门在硫酸盐型土壤细菌群落中相对丰度达到 35.29%，而在氯化—硫酸盐型土壤细菌群落中只有 6.7%。本研究中的 4 种盐碱土壤中均有未能识别（unclassified）的细菌群落，相对丰度在 1.25% ~ 10.04%，其中氯化—硫酸盐土壤占比最高。

分析属水平下细菌的分类组成能够为细菌门类提供更完整的信息。在属水平下（图 4），4 个不同类型盐碱土壤检测到的 OTU 全部被划分到 517 个不同细菌属。将相对丰度小于 5% 的细菌属合并后，各样本中主要存在 8 种主要的菌属：盐单胞菌属（*Halomonas*）、*Gillisia* 菌属、*Pseudarthrobacter* 菌属、嗜碱芽孢杆菌属（*Bacillas*）、*Rubellimicrobium* 菌属、*Adhearibacter* 菌属、*Salegentibacter* 菌属、腈基降解菌属（*Nitriliruptoraceae*）。硫酸—氯化物盐型土壤中 *Gillisia* 菌属、*Salegentibacter* 菌属和腈基降解菌属（*Nitriliruptoraceae*）相对丰度均大于 5%，*Gillisia* 菌属 11.53%，而其他菌属含量较低。氯化—硫酸盐型中盐单胞菌属和 *Gillisia* 菌属的相对丰度分别达到 23.18% 和 12.63%，其中 *Gillisia* 菌属的相对丰度与硫酸—氯化物盐型相似。碳酸盐型土壤中的嗜碱芽孢杆菌属丰度最高，达到 11.36% 且显著高于其他菌属。硫酸盐型土壤中 *Pseudarthrobacter* 菌属、*Adhearibacter* 菌属和 *Rubellimicrobium* 菌属丰度最高，分别为 14.96%、10.69% 和 9.79%。

基于 OTU 分类对 4 种不同盐碱土壤细菌群落进行聚类分析发现（图 5），不同类型土壤样品可分为 3 类，硫酸—氯化物盐型和氯化—硫酸盐型聚为一类，而硫酸盐型和碳酸盐型单独聚为一类。

2.5　细菌群落与环境因子的关系

微生物群落结构不仅受到生物因素影响，土壤环境的影响也是密不可分的。如图 6 环境因子中全盐和 HCO_3^- 两个因子对微生物群落组成影响较大，其中第一序轴的解释量为 57.2%，第二序轴为 29.94%。通过 Heatmap 相关性分析，体现了在门水平上不同盐碱土壤群落与其所在土壤环境因子在梯度水平上的分布格局。通过 Spearman 相关性分析，选取门水平相对丰度前 50 的物种进行 Heatmap 相关分析（图 7）。结果表明，氯离子和硫酸根离子与门水平上物种分布有明显的正相关关系（$P<0.01$），而 pH、全盐、碱解氮、速效磷与门水平上物种组成有显著的负相关关系（$P<0.01$）。从物种的分布来看，BRC1 与速效磷有显著的负相关（$P<0.01$）。硝化螺旋菌门（Nitrospirae）与全盐和硝酸根都有显著的负相关（$P<0.01$）。拟杆菌门（Bacteroidetes）与氯离子和硫酸根离子有显著的正相关性

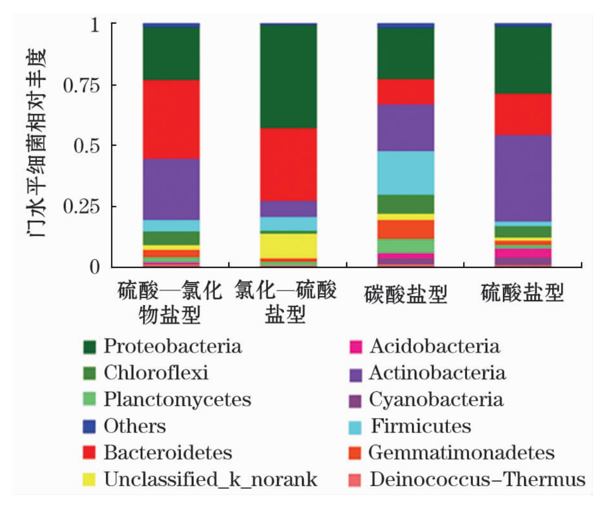


图 3　门水平下的土壤细菌群落

Fig. 3　Soil bacterial communities at phylum level

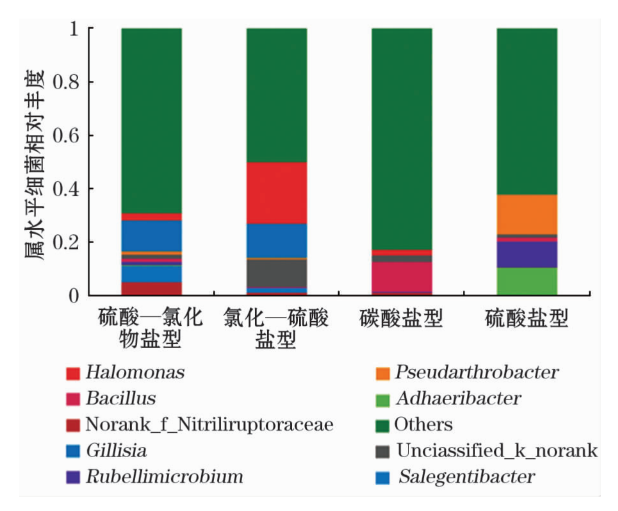


图 4　属水平下的土壤细菌群落

Fig. 4　Soil bacterial communities at the genus level

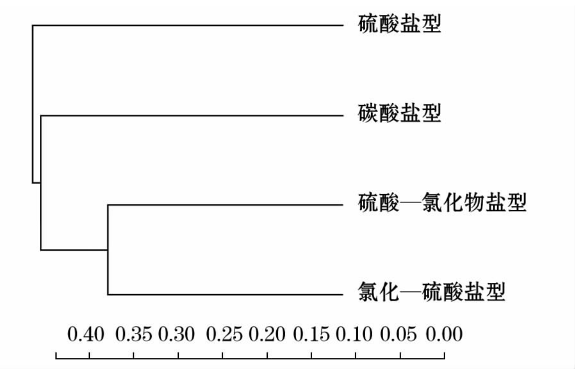


图 5　样品的聚类分析

Fig. 5　Cluster analysis of the samples

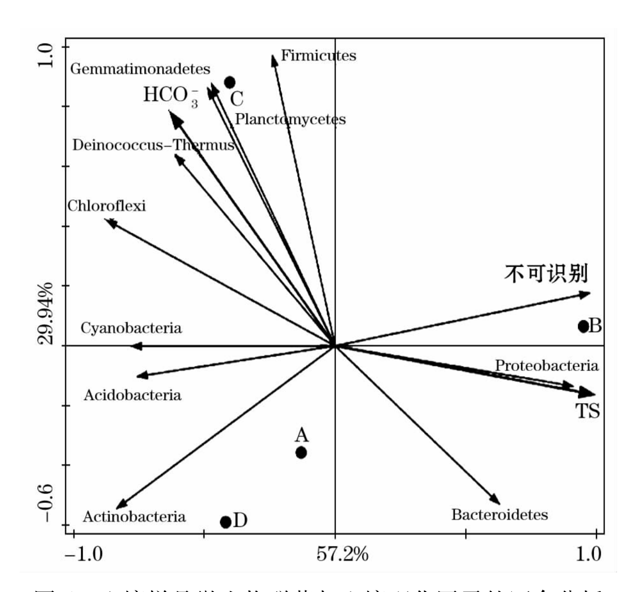


图 6 土壤样品微生物群落与土壤理化因子的冗余分析

Fig. 6 Redundancy analysis between the soil microbial communities and the soil physiochemical properties

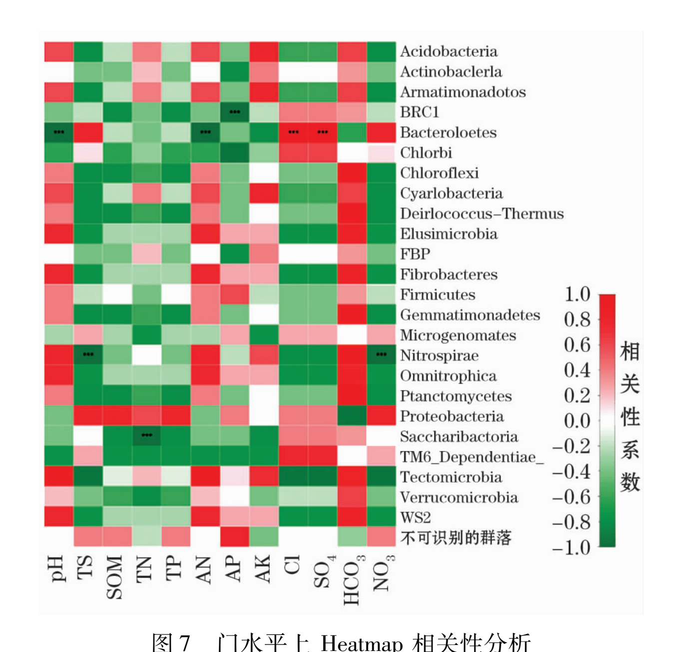


图 7 门水平上 Heatmap 相关性分析

Fig. 7 Heatmap correlationship analysis at the phylum level

表 4 门水平上 Mantel test 检验结果

Tab. 4 Mantel test for environmental factors at phylum level

环境因子	Mantel test (*r* statistics)	*P*-value (*P*)	Number of permu	Tail Type	环境因子	Mantel test (*r* statistics)	*P*-value (*P*)	Number of permu	Tail Type
pH	0.429 15	0.394	999	two-side	AP	-0.200 92	0.652	999	two-side
TS	0.938 41	0.042	999	two-side	AK	-0.691 98	1	999	two-side
SOM	-0.160 96	0.515	999	two-side	Cl^-	0.466 01	0.046	999	two-side
TN	-0.408 3	0.913	999	two-side	SO_4^{2-}	0.443 33	0.047	999	two-side
TP	-0.197 54	0.631	999	two-side	HCO_3^-	0.499 44	0.338	999	two-side
AN	-0.546 82	0.954	999	two-side	NO_3^-	0.555 3	0.046	999	two-side

注:Mantel test 为 *r* 统计值,*P*-value 为 *P* 值大小,Number of permu 为置换检验的次数,Tail Type 为检验的方法。

($P<0.01$),同时与碱解氮和 pH 有显著的负相关($P<0.01$)关系,表明拟杆菌门对盐碱土壤中环境因子的变化比较敏感,结合样品的物种组成来看,拟杆菌门的细菌群落能够较好地适应以氯化盐和硫酸盐为主的盐碱土壤中。Mantel test(表 4)统计结果表明,环境因子与门水平的物种之间具有较大的相关性,而其中全盐、氯离子、硫酸根离子和硝酸根离子对门水平物种的影响显著($P<0.05$),该结果与 Heatmap 相关性分析结果相一致,进一步证明分析的可靠性。

3 讨论

自然条件下,盐碱土壤中的盐分总是由不同类型的盐分混合组成,氯化物和硫酸盐是盐分的主要构成成分[21],这两种盐分在土壤溶液中的物理化学性质有明显的差异,而两种盐分潜在的渗透势不同也会对土壤微生物造成影响[22]。乔正良等[23]对陕西 5 种类型的盐渍微生物数量的研究发现,苏打盐土(碱土)微生物数量最多,其次是硫酸盐—氯化物盐型和氯化物—硫酸盐型,而硫酸盐土和氯化物盐土中微生物的数量最少。Dilfuza 等[24]发现,灌溉导致的次生盐渍化土壤中 Ca^{2+}、Na^+、CO_3^{2-} 和 Cl^- 积累,土壤微生物数量下降,微生物量的减少与 Na^+ 和 Cl^- 的毒害有关。王飞[25]的研究表明,随盐分浓度升高,土壤中微生物总量下降,氯化盐对土壤微生物量的抑制作用要高于硫酸盐。本次研究中硫酸—氯化物盐型和氯化—硫酸盐型土壤的微生物数量显著少于碳酸盐型和硫酸盐型,尤其是以氯化盐为主的氯化物—硫酸盐型,这与前人的研究结果类似,表明不同类型的

盐渍化土壤能够影响土壤微生物量。

本研究对干旱区玛纳斯河流域不同盐碱土壤的细菌群落组成在门、属和 OTU 水平进行了分析,根据分布特征显示,在 4 种盐碱土壤中均存在较为一致的优势菌群。而一些丰度相对较低的细菌种群在各盐碱土壤中所占比例和种类均呈现较大的差异。通过对门水平群落组成的研究发现,在不同盐碱土壤的群落组成中变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)和放线菌门(Actinobacteria)拥有较高的相对丰度。这 3 类细菌是大多数干旱区土壤中的优势菌[26-29]。牛世全等[11]和 Liu 等[30]发现,变形菌门、放线菌门、酸杆菌门(Acidobacteria)和拟杆菌门大量出现在内陆和滨海地区的盐碱地土壤中,这也与本研究结果相似,说明相似的盐碱环境中细菌类群的分布具有一定的相似性,也表明这类细菌群落在盐碱土壤生态系统中占有重要地位,对于维持生态系统稳定性有重要作用。

盐渍环境中的微生物具有特殊的结构、生理机制及特殊的代谢产物,其应用备受科学家们的关注[31-32]。利用耐盐碱微生物修复盐碱土壤已经成为生物改良盐碱地的重要手段。田晓亮[33]、崔增杰[34]、王纶等[35]分别对不同地区的盐碱农田施入微生物肥料后作物产量均有显著的提高,且降低了土壤盐渍化水平,改善土壤环境。为了开发高效的微生物菌剂,首先要获得耐受盐碱且对盐碱有去除作用的生物菌株,目前对于盐碱耐受微生物资源的开发和研究中,基于对菌株盐或碱的耐受性评价,分别称作嗜盐菌和嗜碱菌[36]。本次研究中在氯化物—硫酸盐型和碳酸盐型盐碱土壤中的优势菌属,盐单胞菌属(*Halomonas*)和芽孢杆菌属(*Bacillus*)也是嗜盐嗜碱菌的主要菌属[37-38]。这两类细菌多生长于盐湖、盐碱湖、死海、盐场和海洋中,腌鱼、咸肉等盐制品上也存在[39]。Kroll 等[40]认为,嗜碱菌生长不需要高的盐离子,最适生长 pH 在 10～12,而 pH 在 6.5 以下不能生长或生长极为缓慢,而耐盐性嗜碱菌不仅需要 pH 大于 9 的环境,而且需要较高盐度。赵媛等[41]在对芽孢杆菌属和盐单胞菌属的耐盐碱试验发现,2 株细菌的降盐降碱率均无显著差异。潘媛媛等[42]对松嫩苏打盐碱地嗜盐菌多样性的研究表明,苏打盐碱地中的优势种群依次为盐单胞菌属 12.5%、芽孢杆菌属 10%、大洋杆菌属(Oceanbacillus)10%。嗜盐菌和嗜碱菌之间的确存在不同的适应机理,包括不同细胞组织结构、离子运输渗透机理、酶的代谢合成[36,43-45]等,但自然环境中高盐常与高碱相伴出现,部分嗜盐菌体内应该同时具备嗜盐和嗜碱机制,这类细菌具有很高的应用潜力,而其耐盐碱胁迫的机理机制有待进一步的研究。

4 结 论

(1) 碳酸盐型土壤细菌群落的丰度和多样性均高于其他 3 类盐碱土壤细菌群落。

(2) 通过对土壤样品细菌群落组成的分析发现,在门水平上变形菌门(Proteobacteria)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、放线菌门(Actinobacteria)是硫酸—氯化物盐型、氯化—硫酸盐型、硫酸盐型土壤的优势菌群。碳酸盐型以厚壁菌门(Firmicutes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)为优势菌群。属水平上,各样品群落存在较大差异。

(3) 4 种不同类型盐碱地土壤细菌群落主要分为 3 类,具有相似盐分组成的硫酸—氯化物盐型和氯化—硫酸盐型分为一类,硫酸盐型和碳酸盐型分为一类,盐分类型对细菌数量有显著的影响。

(4) 通过环境因子与微生物群落关系的研究表明,全盐、氯离子、硫酸根离子和硝酸根离子对物种分布具有显著($P<0.05$)影响。

参考文献(References):

[1] Shaw R J, Coughlan K J, Beli L C. Sodic soils: Distribution, properties, management and environmental consequences[C]//Sumner M E, Naidu R. Root Zone Sodicity, 1998: 95-106.

[2] 俞仁培,陈德明. 我国盐渍土资源及其开发利用[J]. 土壤通报, 1999, 30(4): 158-159. [Yu Renpei, Chen Deming. Saline soil resources and utilization in China[J]. Chinese Journal of Soil Science, 1999, 30(4): 158-159.]

[3] 熊毅. 中国盐渍土分区[J]. 土壤学报, 1957, 5(1): 50-60. [Xiong Yi. China salt soil zoning[J]. Acta Pedologica Sinica, 1957, 5(1): 50-60.]

[4] 文振旺. 新疆盐渍土改良问题[J]. 新疆农业科学, 1960(6): 211-215. [Wen Zhenwang. The problem of salt soil improvement in Xinjiang[J]. Xingjiang Agricultural Science, 1960(6): 211-215.]

[5] 毛培宏,金湘,王芸,等. 新疆特殊环境微生物资源的研究与发展[J]. 生物技术, 2006(5): 88-91. [Mao Peihong, Jin Xiang, Wang Yun, et al. Research and development on research of micro-

organism in Xinjiang〔J〕. Special Environment Biotechnology,2006(5):88－91.〕

〔6〕 孙慧,张建锋,许华森,等. 余姚滨海不同盐碱度土壤微生物群落组成及土壤酶活性的变化〔J〕. 应用生态学报,2016,27(10):3 361－3 370.〔Sun Hui,Zhang Jianfeng,Xu Huasen,et al. Variations of soil microbial community composition and enzyme activities with different salinities on Yuyao coast〔J〕. Chinese Journal of Applied Ecology,2016,27(10):3 361－3 370.〕

〔7〕 李新. 不同盐碱程度盐碱土壤微生物多样性研究〔D〕. 呼和浩特:内蒙古师范大学,2015.〔Li Xin. Studies on Soil Microbial Community Structure Diversity in Different Degrees of Saline-Alkaline Soil〔D〕. Hohhot:Inner Mongolia Normal University,2015.〕

〔8〕 许芳芳. 荒漠植物耐盐碱 PGPR 的分离筛选及其对盐胁迫下三种植物的促生效应和机理〔D〕. 呼和浩特:内蒙古农业大学,2017.〔Xu Fangfang. Solation of Saline-Alkaline Tolerant PGPR of Desert Plant and Their Effect of Growth Promotion and Mechanism on Three Plants under Salt Stress〔D〕. Hohhot:Inner Mongolia Agricultural University,2017.〕

〔9〕 龚佳. 四种灌木对盐碱胁迫的生理响应及其对土壤主要肥力指标的影响〔D〕. 银川:宁夏大学,2017.〔Gong Jia. Physiological Responses of Four Shrubs to Saline-Alkali Stress and Its Effect on Soil Fertility〔D〕. Yinchuan:Ningxia University,2017.〕

〔10〕 张慧敏,郭慧娟,侯振安. 不同盐碱胁迫对土壤细菌群落结构的影响〔J〕. 新疆农业科学,2018,55(6):1 074－1 084.〔Zhang Huimin,Guo Huijuan,Hou Zhenan. Effects of saline and alkaline stress on soil bacterial community structure〔J〕. Xijiang Agricultural Science,2018,55(6):1 074－1 084.〕

〔11〕 牛世全,龙洋,李海云,等. 应用 Illumina MiSeq 高通量测序技术分析河西走廊地区盐碱土壤微生物多样性〔J〕. 微生物学通报,2017,44(9):2 067－2 078.〔Niu Shiquan,Long Yang,Li Haiyun,et al. Microbial diversity in saline alkali soil from Hexi Corridor analyzed by Illumina Mi Seq high-throughput sequencing system〔J〕. Microbiology China,2017,44(9):2 067－2 078.〕

〔12〕 俞冰倩,杨赛,朱琳,等. 响应土壤阴离子类型的盐碱土古细菌群落多样性研究〔J〕. 中国环境科学,2018,38(7):2 731－2 739.〔Yu Bingqian,Yang Sai,Zhu Ling,et al. Diversity characteristic of archaeal community responding to soil anion in saline-alkali soil〔J〕. China Environmental Science,2018,38(7):2 731－2 739.〕

〔13〕 柳梅英,包安明,陈曦,等. 近 30 年玛纳斯河流域土地利用/覆被变化对植被碳储量的影响〔J〕. 自然资源学报,2010,25(6):926－938.〔Liu Meiying,Bao Anming,Chen Xi,et al. Impact of land use/cover change on the vegetation carbon storage in the Manas river basin between 1976 and 2007〔J〕. Journal of Natural Resources,2010,25(6):926－938.〕

〔14〕 张添佑,王玲,罗冲,等. 玛纳斯河流域土壤盐渍化时空动态变化〔J〕. 水土保持研究,2016,23(1):228－233.〔Zhang Tianyou,Wang Ling,Luo Chong,et al. Spatiotemporal change of soil salinization in Manasi River Basin〔J〕. Research of Soil and Water Conservation,2016,23(1):228－233.〕

〔15〕 王海江. 玛纳斯河流域土壤盐渍化过程和格局特征及盐渍土改良模式探讨〔D〕. 北京:中国农业大学,2014.〔Wang Haijiang. Processes,Patterns and Reclamation of Soil Salinization at Manas River Basin〔D〕. Beijing:China Agricultural University,2014.〕

〔16〕 鲍士旦. 土壤农化分析〔M〕. 3 版. 北京:中国农业出版社,2000.〔Bao Shidan. Soil Agrochemical Analysis〔M〕. 3rd. Beijing:China Agricultural Press,2000.〕

〔17〕 Xiong J B,Liu Y Q,Lin X G,et al. Geographic distance and pH drive bacterial distribution in alkaline lake sediments across Tibetan Plateau〔J〕. Environmental Microbiology,2012,14(9):2 457－2 466.

〔18〕 Edgar R C,Haas B J,Clemente J C,et al. UCHIME improves sensitivity and speed of chimera detection〔J〕. Bioinformatics,2011,27(16):2 194.

〔19〕 Quast C,Pruesse E,Yilmaz P,et al. The SILVA ribosomal RNA gene database project:Improved data processing and web-based tools〔J〕. Nucleic Acids Research,2013,41(D1):D590－D596.

〔20〕 Schloss P D,Gevers D,Westcott S L. Reducing the effects of PCR amplification and sequencing artifacts on 16S rRNA-based studies〔J〕. Plos One,2013,6(12):e27310.

〔21〕 Wang Z Q,Zhu S Q,Yu R P. Soil-Affected Soils in China〔M〕. Beijing:Science Press,1991.

〔22〕 Li X G,Li F M,Ma Q F,et al. Interactions of NaCl and Na_2SO_4 on soil organic C mineralization after addition of maize straws〔J〕. Soil Biology & Biochemistry,2006,38(8):2 328－2 335.

〔23〕 乔正良,来航线,强郁荣,等. 陕西主要盐碱土中微生物生态初步研究〔J〕. 西北农业学报,2006,15(3):60－64.〔Qiao Zhengliang,Lai Hangxian,Qiang Yurong,et al. Primary study on microorganism ecology in saline-alkali soil of Shaanxi Province〔J〕. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica,2006,15(3):60－64.〕

〔24〕 Dilfuza E,Giancarlo R,Stephan W,et al. Secondary salinity effects on soil microbial biomass〔J〕. Biology & Fertility of Soils,2010,46(5):445－449.

〔25〕 王飞. 盐分对土壤微生物多样性及土壤有机物转化的影响〔D〕. 石河子:石河子大学,2011.〔Wang Fei. Study on Soil Microbial Molecular Diversity and Organic Matter Transformation under Soil Salinization Condition〔D〕. Shihezi:Shihezi University,2011.〕

〔26〕 Li T,Wang P,Wang P. Bacterial and archaeal diversity in surface sediment from the south slope of the south China sea〔J〕. Acta Microbiologica Sinica,2008,48(3):323.

〔27〕 Orlando J,Alfaro M,Bravo L,et al. Bacterial diversity and occurrence of ammonia-oxidizing bacteria in the Atacama Desert soil during a “desert bloom” event〔J〕. Soil Biology & Biochemistry,2010,42(7):1 183－1 188.

〔28〕 Nagy M L,Alejandro Pérez,Garcia-Pichel F. The prokaryotic diversity of biological soil crusts in the Sonoran Desert (Organ Pipe Cactus National Monument,AZ)〔J〕. Fems Microbiology Ecology,2010,54(2):233－245.

[29] Angélique Chanal, Chapon V, Benzerara K, et al. The desert of Tataouine: An extreme environment that hosts a wide diversity of microorganisms and radiotolerant bacteria [J]. Environmental Microbiology, 2006, 8(3): 514 – 525.

[30] Liu W, Zhang W, Liu G, et al. Microbial diversity in the saline-alkali soil of a coastal *Tamarix chinensis* woodland at Bohai Bay, China[J]. Journal of Arid Land, 2016, 8(2): 284 – 292.

[31] Oren A. Diversity of halophilic microorganisms: Environments, phylogeny, physiology, and applications[J]. Journas of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2002, 28(1): 56 – 63.

[32] Margesin R, Schinner F. Potential of halotolerant and halophilic microorganisms for biotechnology [J]. Extremophiles, 2001, 5 (2): 73 – 83.

[33] 田晓亮. 微生物肥料改良大庆盐碱地作用及效果研究[D]. 哈尔滨:东北林业大学, 2010. [Tian Xiaoliang. Micro-Ganisms Fertilizer and Its Effectiveness Evaluation Improvement Saline-Alkali Soil in Daqing[D]. Harbin: Innner Northeast Forestry University, 2010.]

[34] 崔曾杰, 耿艳秋, 范丽丽, 等. 生物菌肥对盐碱地水稻生长发育及产量的影响[J]. 东北农业科学, 2013, 38(5): 32 – 35. [Cui Cengjie, Geng Yanqiu, Fan Lili, et al. Effects of bacterial manure on the growth and yield of rice growing in saline-alkali land[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2013, 38(5): 32 – 35.]

[35] 王纶, 王星玉, 王树红, 等. GPIT 生物制剂对盐碱地玉米的增产效果[J]. 山西农业科学, 2011, 39(9): 963 – 965. [Wang Lun, Wang Xinyu, Wang Shuhong, et al. Yield improvement effect of GPIT biological agents for Maize saline-alkali soil[J]. Journal of Shanxi Agricultural Sciences, 2011, 39(9): 963 – 965.]

[36] 燕红, 钟方, 高新亮, 等. 耐盐碱菌株的分离筛选及生物学特性和盐碱去除效率的研究[J]. 生态学杂志, 2012, 31 (4): 1 001 – 1 008. [Yan Hong, Zhong Fang, Gao Xinliang, et al. Isolation and screening of saline-alkali tolerant bacterial strains and the biological chanracteristics and salt-alkail removal efficiency of the strain screened [J]. Chinese Journal of Ecology, 2012, 31 (4): 1 001 – 1 008.]

[37] 曹军卫, 沈萍, 李朝阳. 嗜极微生物[M]. 武汉:武汉大学出版社, 2004. [Cao Junwei, Sheng Ping, Li Chaoyang. Extremophile [M]. Wuhan: Wuhan University Press, 2004.]

[38] Arahal D R. Phylogeny of the family Halomonadaceae based on 23S and 16S rDNA sequence analyses[J]. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52 (1): 241 – 249.

[39] Lei Z, Qiu P, Ye R, et al. *Bacillus shacheensis* sp nov. a moderately halophilic bacterium isolated from a saline-alkali soil [J]. The Journal of General and Applied Microbiology, 2014, 60(3): 101 – 105.

[40] Kroll R G. Alkaliphiles[M]. New York: Mc Graw-Hill, 1990.

[41] 赵媛, 何彩霞, 杨国柱, 等. 青海湖耐盐微生物分离及对盐碱降解率的研究[J]. 黑龙江畜牧兽医, 2018(13): 16 – 19, 240. [Zhao Yuan, He Caixia, Yang Guozhu, et al. Isolation of salt-tolerant microorganisms from Qinghai lake and the effect ofdegradation rate on salt-alkali[J]. Heilongjiang Animal Science and Veterinary Medicine, 2018(13): 16 – 19, 240.]

[42] 潘媛媛, 黄海鹏, 孟婧, 等. 松嫩平原盐碱地中耐(嗜)盐菌的生物多样性[J]. 微生物学报, 2012, 52(10): 1 187 – 1 194. [Pan Yuanyuan, Huang Haipeng, Meng Jin, et al. Biodiversity of culturable halotolerant and halophilic bacteria from saline-alkali soils in Songnen plain [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2012, 52 (10): 1 187 – 1 194.]

[43] Ishibashi M, Arakawa T, Philo J S, et al. Secondary and quaternary structural transition of the halophilic archaeon nucleoside diphosphate kinase under high-and low-salt conditions[J]. Fems Microbiology Letters, 2002, 216(2): 235 – 241.

[44] Madern D, Zaccai G. Molecular adaptation: The malate dehydrogenase from the extreme halophilic bacterium Salinibacter ruber behaves like a non-halophilic protein[J]. Biochimie (Paris), 2004, 86 (4 – 5): 295 – 303.

[45] Mevarech M, Frolow F, Gloss L M. Halophilic enzymes: Proteins with a grain of salt[J]. Biophysical Chemistry, 2000, 86(2): 155 – 164.

Diversity of Bacterium Communities in Saline or Alkaline Soil in Arid Area

WANG Wei-qi, Li Bian-bian, ZHANG Jun, YANG Lei, ZHANG Feng-hua

(*Key Laboratory of Oasis Eco-agriculture of Xinjiang Corps of Production and Construction*, *Shihezi University*, *Shihezi* 832003, *Xinjiang*, *China*)

Abstract: The high throughput sequencing was used to sequence the bacterium communities in four types of saline or alkaline soil including the sulfate-chloride, chloride-sulfate, carbonate and sulfate types. The 137 822 gene sequences were obtained from the soil samples. The results revealed that the Shannon and Chao1 indexes were in an order of carbonate > sulfate > sulfate-chloride > chloride-sulfate, which indicated that the diversity and abundance of soil bacterial communities in carbonate soil samples were significantly higher than those in the other soil samples. In this study, the saline or alkaline soil was mainly comprised of ten phyla. The dominant bacterial phyla were the Proteobacteria, Bacteroidetes and Actinobacteria in sulfuric acid-chloride, chlorinated-sulfate and sulfate soils separately. The Firmicutes, Proteobacteria and Actinobacteria were the dominant populations in carbonate soil. At the genus level, the composition of soil bacterial communities was different from each other. As shown in the cluster analysis, the bacterial communities of all soils were divided into three groups. One was made up of sulfuric acid-chloride salt and chlorinated-sulfate soils, and the others were composed of sulfate and carbonate soils. Effects of the contents of total salt, chlorine, sulfate and nitrates on the bacterial communities were significant ($P < 0.05$). There were the significant differences in bacterial communities within several types of saline or alkaline soil in the Manas River Basin, and also many types of bacterial communities, especially in carbonate-type soils. The results revealed the composition of bacterial communities in different types of saline or alkaline soil and the main environmental factors affecting the community composition, which provided a scientific basis for developing the microbial resources in saline or alkaline soil and improving it.

Key words: saline or alkaline soil; soil microorganism; high throughput sequencing; bacterium community; diversity; Xinjiang